

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Katedra fyziologie živočichů



Andrea Vrtílková

Vztah cirkadiánního systému a buněčného cyklu

The relationship between circadian system and cell cycle

Bakalářská práce

RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2016

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za mnoho cenných rad, nekončící ochotu a zároveň čas, který věnovala pročitání této práce. Velmi si také vážím jejího milého a profesionálního přístupu.

ABSTRAKT

Cirkadiánní systém je schopný samostatné oscilace díky translačně-transkripční smyčce. Komponenty této smyčky neovlivňují jen svůj vlastní chod, ale mají vliv i na další funkce buňky jako například buněčný cyklus. Tato interakce je zajištěna jak hodinovými proteiny (PER, CRY aj.), tak hodinami-kontrolovanými proteiny (WEE1, TIM, XPA aj.). Ty ovlivňují průchod fázemi buněčného cyklu a mají vliv na kontrolní body. Pokud jsou cirkadiánní rytmy narušeny, může to mít za následek nepřesnost kontrolních bodů buněčného cyklu, hromadění chyb vlákna DNA a zvýšenou apoptózu buněk či tvorbu nádorů.

Klíčová slova: cirkadiánní systém, buněčný cyklus, WEE1, XPA, P21, C-Myc, TIM, PER

ABSTRACT

The circadian system is able to oscillate by itself owing to the transcriptional-translation feedback loop. Components of this loop do not affect just their own run, but they also have an impact on some other functions of the cell, for example cell cycle. This interaction is made by clock proteins (PER, CRY etc.) and by clock-controlled proteins (WEE1, TIM, XPA etc.). These proteins participate in the cell cycle run and have an impact on check-points. Disruption of the circadian clock can cause faults in cell cycle check-points, storing of DNA damages and increased cell apoptosis or tumor progression.

Key words: circadian systém, cell cycle, WEE1, XPA, P21, C-Myc, TIM, PER

POUŽITÉ ZKRATKY

RHT	-	retinohypotalamický trakt
SCN	-	suprachiasmatického jádra
PACAP	-	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
CLOCK	-	circadian locomotor output cycles kaput
BMAL1	-	brain and muscle Arnt-like protein 1
PER	-	period
CRY	-	cryptochrome
CK1 ϵ CK1 δ	-	kaseinovou kinázou ϵ a kaseinovou kinázou δ
FASP	-	familial advanced sleep phase syndrom
CCN	-	cyclin
CDK	-	cyklin-dependentní kinázy
Cdc (20/25)	-	cell division cycle
CKI	-	CDK-inhibitor
pRb	-	retinoblastomní protein
E2F, DP1, DP2	-	transkripčními faktory
SCF	-	Skp/Cullin/F-box Containing Complex
APC/C	-	anaphase-promoting complex
CDH1	-	cadherin-1
Thr	-	threonin
Tyr	-	tyrosin
Ser	-	serin
CAK	-	cyclin-activating kináze
CIP/KIP	-	cyklin-dependant inhibitor/kináze interacting protein
INK4	-	inhibitor protein kináze 4
PCNA	-	proliferating cell nuclear antigen
CHK1	-	check-point kinázy
ATR	-	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
Plk1	-	polo-like kináze1
ATM	-	ataxia telangiectasia mutated
RENT	-	regulator of nucleolar silencing and telophase exit

CAD	-	kaspázou aktivovaná DNáza
MDM2	-	mouse double minute 2 homolog
FADD	-	Fas-associated protein with death domain
DISC	-	death inducing signaling complex
TIM	-	timeless
CCD	-	coiled-coil domeny
TIPIN	-	timeless interacting protein
bHLH	-	helix-loop-helix
TfR1	-	transferinový receptor 1
LKP	-	Lewisův karcinom plic
NER	-	nukleotidová excizní oprava
HERC2	-	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM	2
2.1	MOLEKULÁRNÍ PODSTATA CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ	2
2.1.1	HODINOVÉ GENY	2
2.1.2	POSTTRANSKRIPČNÍ a POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVY	3
3	BUNĚČNÝ CYKLUS	4
3.1	G1 FÁZE – S FÁZE	5
3.2	S FÁZE – G2 FÁZE	6
3.3	M FÁZE	6
3.4	CDK inhibitory	6
3.5	CHECK-POINT KINÁZY	7
3.6	APOPTÓZA	8
3.6.1	VNITŘNÍ CESTA	8
3.6.2	VNĚJŠÍ CESTA	9
3.7	NÁDOROVÉ BUJENÍ	9
4	INTERAKCE BUNĚČNÉHO CYKLU A CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ	10
4.1	P21	11
4.2	TIM	11
4.3	WEE1	12
4.4	C-MYC	13
4.5	PER	14
4.6	XPA	16
4.7	VLIV SVĚTLA	17
5	ZÁVĚR	18
6	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	19

1 ÚVOD

Střídání světla, tmy a další periodicky se opakující vlivy prostředí, měly za následek vývoj cirkadiánního systému, který je schopný řídit fyziologické pochody či regulovat chování s přibližně 24hodinovou periodou i za neměnných podmínek (slovo cirkadiánní pochází ze spojení latinských slov *circa* – přibližně a *diem* – den). Hlavní oscilátor se nachází v hypotalamu a generuje cirkadiánní periodu, se kterou se synchronizují periferní hodiny v celém těle. Protože se tato perioda pouze přibližuje 24 hodinám, je nutná synchronizace s vnějším prostředím. Ta probíhá na více úrovních, ale nejdůležitějším Zeitgeberem (neboli vnějším synchronizátorem) je světlo. Retinohypotalamický trakt vede informaci o světle, přijímanou gangliovými buňkami v retině, do suprachiasmatického jádra hypotalamu – sídla hlavních hodin. Dalšími Zeitgebery jsou teplota, příjem potravy, sociální interakce aj.

Rytmus cirkadiánní oscilace je udržován transkripčně-translační zpětnovazebnou smyčkou exprese hodinových genů důležitých pro chod samotných hodin i celého organismu.

Buněčný cyklus je proces mezi dvěma děleními, při kterém buňka prochází řadou změn a kritických momentů, kdy se rozhoduje o jejím dalším osudu – dokončení cyklu nebo nastartování dějů vedoucích k apoptóze. Některé fáze buněčného cyklu jsou velmi citlivé ke škodlivým vlivům vnějšího prostředí. Časování těchto citlivých procesů do určité části dne je tedy výhodným krokem jak ochránit buňku, např. proti UV záření.

Cílem mé práce je shrnutí studií pojednávajících o buněčném cyklu, cirkadiánním systému a jejich propojení. Nejprve popisují zvlášť molekulární podstatu cirkadiánního systému, dále se zaměřuji na buněčný cyklus a jeho jednotlivé fáze. V poslední kapitole je pak přehled jednotlivých proteinů buněčného cyklu, které jsou ovlivněné cirkadiánním systémem a důsledky poruchy tohoto propojení.

2 CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM

Cirkadiánní systém organismů sestává ze vstupních cest, kterými jsou převáděné synchronizační stimuly z vnějšího prostředí do hlavního cirkadiánního pacemakeru a výstupních, signálních drah řídících periferní hodiny v těle a hlavní cirkadiánní rytmy. Vstupní synchronizační cesta světla začíná na sítnici, kde se dopadající fotony světla transdukují do nervového vzruchu, který je dále veden retinohypotalamickým traktem (RHT) do suprachiasmatického jádra (SCN) hypotalamu, které je uloženo nad křížením optických nervů v přední části hypotalamu. SCN funguje jako hlavní cirkadiánní hodiny schopné vytvářet a udržovat rytmy, a synchronizovat je se světelnými podmínkami prostředí tak, aby výsledná časová informace, předávaná periferním hodinám ve tkáních, byla v souladu s vnějším časem. Periferní hodiny tedy nejsou řízené světlem přímo, ale pouze přes SCN, kromě toho se jejich aktivita koriguje také nesvětelnými vnějšími stimuly jako je příjem potravy nebo teplota (Kwon et al., 2011).

Kromě tyčinek a čípků, fotoreceptorů nezbytných pro obrazové vidění, se na sítnici vyskytují ještě fotosenzitivní sítnicové gangliové buňky, které jsou hlavním zdrojem informací o světle pro SCN. Tyto gangliové buňky obsahují melanopsin, který je důležitý pro transdukcii energie fotonu na změnu membránového potenciálu, která je potom vedena přes RHT k neuronům SCN. Na synapsi s SCN jsou po osvětlení vyplavovány neurotransmitery glutamát a PACAP (Bedont et al., 2015; Ruby et al., 2002).

2.1 MOLEKULÁRNÍ PODSTATA CIRKADIÁNNÍCH OSCILACÍ

2.1.1 HODINOVÉ GENY

Hodinové geny a jejich zpětnovazebné regulační smyčky jsou podstatou endogenního molekulárního mechanismu, který generuje cirkadiánní rytmy. Mezi tyto geny patří např. *Circadian locomotor output cycles kaput (Clock)*, *Brain and muscle Arnt-like protein 1 (Bmal1)*, *geny Period (Per1, Per2)*, *Cryptochrome (Cry1 a Cry2)*, *Rora* a *Rev-Erba*, viz *obrázek 1* (Kondratova et al., 2012). Místo CLOCK se v nervové tkáni objevuje také NPAS2, funkce zůstává stejná (Ko et al., 2006).

Základem regulační smyčky jsou proteiny CLOCK a BMAL1. Proteinový komplex CLOCK/BMAL1 řídí chod hodin navázáním na E-box sekvenci uvnitř promotorové oblasti genů *Rora*, *Rev-Erba*, *Per* a *Cry*. Proteinové produkty genů PER a CRY tvoří komplex, jehož hladina se v cytoplasmě během dne zvyšuje a při určité koncentraci vstupuje do jádra, kde tlumí svojí vlastní transkripci a blokuje aktivitu diméru CLOCK/BMAL1. Přes noc je pak PER/CRY komplex

degradován aparátem proteasomu, hladina PER/CRY ubývá, inhibiční vazba ke komplexu CLOCK/BMAL1 se uvolňuje a nastává nový cyklus aktivace transkripce genů obsahujících sekvenci E-box. Jedná se o první z negativních zpětných vazeb (Ko et al., 2006).

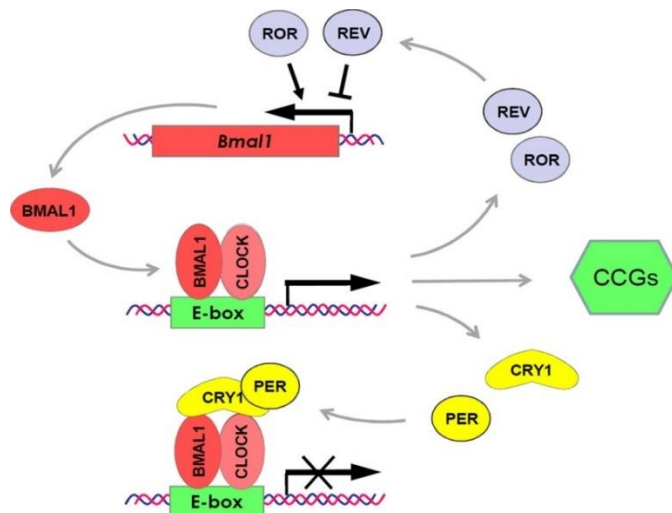
Dále zahajuje CLOCK/BMAL1 navázáním na E-box expresi *Ror* (α , β , γ) a *Rev-Erb* (α , β) řazených do podrodiny jaderných orphanových receptorů (jaderné receptory, které nemají známý ligand) (Kliewer et al., 1999). Jejich proteiny pak spolu soutěží o navázání do RORE sekvence promotorové oblasti genu *Bmal1*, čímž se mění hladiny komplexu CLOCK/BMAL1 v jádře. Pokud se do RORE sekvence genu *Bmal1* naváže monomer REV-ERB α , který funguje jako inhibitor, snižuje se transkripce tohoto genu. Touto negativní zpětnou vazbou REV-ERB α tedy nepřímo ovlivňuje svojí vlastní transkripci. Proteiny ROR α jsou naopak aktivátory transkripce *Bmal1*. PER/CRY komplex v jádře tedy inhibicí CLOCK/BMAL1 zastaví nejen svojí vlastní transkripci, ale zároveň i transkripci *Rev-erb α* . ROR α tak má volnou cestu k navázání na RORE sekvenci a opět aktivuje expresi *Bmal1*. Díky antagonistickému efektu REV-ERB α a ROR α je tedy možné velmi jemné řízení hladiny BMAL1 (Liu et al., 2008). Jinak řečeno, hladina REV-ERB α je regulována díky vazbě PER/CRY na CLOCK/BMAL1 komplex vázaný na E-box v genu *Rev-erb α* (Jolley et al., 2014). Obě smyčky (PER/CRY; REV-ERB a ROR) dokáží pracovat i nezávisle na sobě, ale pro řízení 24hodinové oscilace je nutná výše popsaná spolupráce (Fuhr et al., 2015; obr. 1).

Kromě toho, že REV-ERB α tvoří spolu s ROR α a BMAL1 smyčku regulující chod cirkadiánních hodin, jsou také tyto dva proteiny jadernými receptory, kontrolujícími chod mnohých dalších fyziologických procesů jako je růst, metabolismus či reprodukce (Rogers et al., 2008).

2.1.2 POSTTRANSKRIPČNÍ a POSTTRANSLAČNÍ ÚPRAVY

Pro fungování endogenního hodinového mechanismu jsou důležité také posttranskripční úpravy jako je sestřih mRNA a polyadenylace (Kojima et al., 2015; Preußner et al., 2016). Důležitou posttranslační úpravou genových produktů je fosforylace kaseinovou kinázou ϵ a kaseinovou kinázou δ (CK1 ϵ CK1 δ). Mutace v těchto dvou kinázách mají vliv na cirkadiánní periodu, která se tím může zkracovat (Ralph et al., 1988). Do popředí zájmu se dostaly po objevení jejich spojitosti s tzv. „familial advanced sleep phase syndrom“ (FASPS), spánkovou poruchou, která se vyskytuje u lidí a při které dochází k předbírání spánkové fáze každý den až o několik desítek minut (Shanware et al., 2011). CK1 ϵ a CK1 δ specificky fosforylují proteiny PER, které tak značí pro degradaci v ubiquitin-proteasomové dráze. Jejich degradací ubývá inhibiční aktivita diméru PER/CRY a zvyšuje se transkripční aktivita BMAL1/CLOCK. Uvnitř jádra je PER proti degradaci

chráněn navázáním na CRY, který takto regulované degradaci nepodléhá. Tímto se autoregulace cirkadiánních hodin ještě zpřesňuje (Akashi et al., 2002).

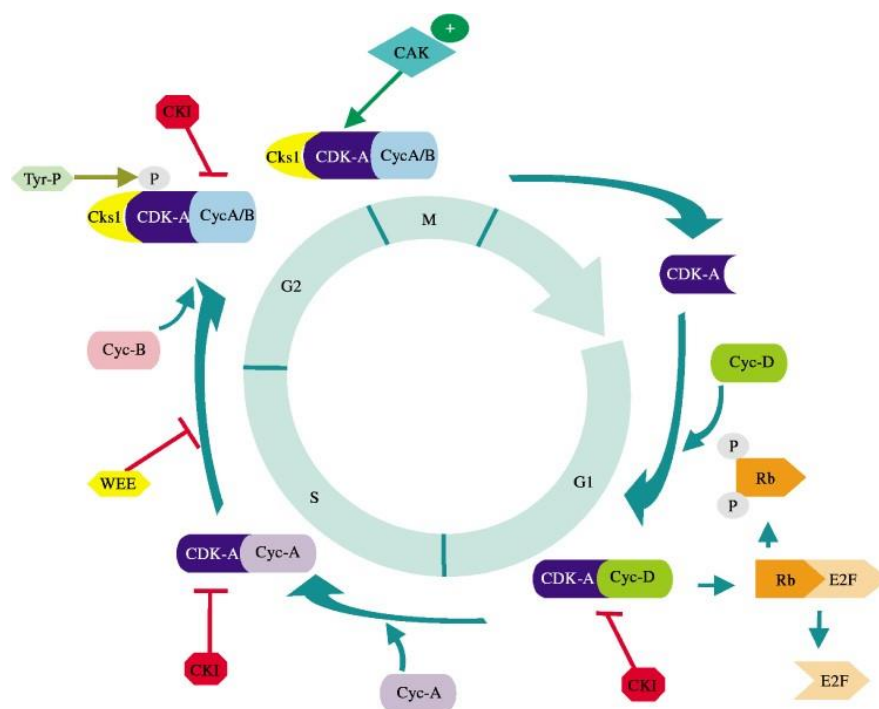


Obrázek 1 - Molekulární hodinový mechanismus - vazba BMAL1/CLOCK na E-box hodinových genů zahajuje transkripci Per, Cry, Ror a Rev-erb. Dimer PER/CRY zpětnovazebně inhibuje svou vlastní expresi vazbou na dimer CLOCK/BMAL1; ROR a REV-ERB kompetují o vazné místo na promotoru genu Bmal1 a tím aktivují, resp. inhibují jeho transkripci. Dimer CLOCK/BMAL1 zahajuje transkripci také mnoha tzv. „clock-controlled genes“ (CCGs). Převzato a upraveno z Kondratova et al., 2012

3 BUNĚČNÝ CYKLUS

Buněčný cyklus je série procesů vedoucích k rozdělení buňky. Sestává z několika fází – G1, S, G2 a M, případně G0, z nichž každá má svou specifickou úlohu a vlastní kontrolní body. Při celém tomto procesu prochází buňka mnoha změnami, mezi nejkritičtější patří replikace DNA, a je tedy nutná mnohonásobná kontrola správnosti jejího provedení. Při S fázi replikuje buňka svoji DNA, v M fázi se potom dělí. G1 a G2 jsou fázemi růstu. Z G1 fáze může buňka přejít do G0, pokud se delší dobu nepřipravuje dělit (např. nervové buňky).

Postup buněčného cyklu směrem k M fázi ovlivňují cykliny (z anglického „*cyclin*“ - CCN) navázáním na cyklin-dependentní kinázy (CDK) typické pro jednotlivé kontrolní body a fáze cyklu. CDK/CCN komplexy fosforylují seriny a threoniny cílových proteinů. Právě cyklické vázání a následná degradace CCN/CDK pohání buněčný cyklus (obr. 2). Cdc25A-B-C (z anglického „*cell division cycle*“) jsou specifické fosfatázy, které odstraňují inhibiční fosfátové zbytky z CDK, je tak umožněna jejich vazba na CCN. Při poškození DNA jsou fosfatázy Cdc25 inhibovány fosforylací, a naopak začínají působit CDK-inhibitory (CKI) či kinázy rodiny WEE1 (WEE1, MYT1), které umožní zastavení buněčného cyklu a opravu chyb.



Obrázek 2 - Proteiny důležité pro jednotlivé fáze buněčného cyklu. Na tomto obrázku jsou znázorněny interakce cyklin-dependentních kináz (CDK) s cykliny (cyc-A/B/D) a ovlivnění dalších složek buněčného cyklu. V G1 fázi se CDK4/6 (CDK-A) váže na cyc-D. Retinoblastomní protein (Rb) tvoří komplex s transkripčním faktorem E2F. CDK4/6 fosforyluje Rb, což uvolní E2F a aktivuje se transkripce. Tomu se při porušení DNA zamezí CDK inhibitory p16 (CKI). V S fázi vzrůstá cyc-A, který ke konci tvoří komplex s CDK1 (CDK-A). Zde může WEE1 (WEE) inhibovat cyklus fosforylací CDK1. Zvyšující se hladina CCN B ale dokáže za pomoci CAK („cyclin-activating kináze“) CDK1 opět aktivovat. Komplex CycA/B-CDK1 zajistí průchod G2/M fázemi. („cyclin (Andrietta et al., 2001)).

3.1 G1 FÁZE – S FÁZE

G1 je nejdelší fází cyklu. Buňka roste a syntetizuje proteiny. Na konci této fáze se nachází první kontrolní bod, ve kterém se rozhodne, jestli se buňka bude dělit, dělení odloží či přejde do G0 klidové fáze. Tato kontrola je řízena převážně kinázou CDK4/6, na kterou se váže cyklin D (CCN D). CCN D v této fázi soutěží s CDK inhibitory p16 o navázání na CDK4/6. P16 je inhibitory CDK4/6 a nedovoluje buňce přejít do další fáze. Pokud převládne hladina CCN D, naváže se na CDK4/6 a tento komplex inaktivuje retinoblastomní protein (pRb). Protein pRb tvoří po většinu cyklu komplex s E2F transkripčními faktory a blokuje tak transkripci genů nezbytných pro syntézu DNA a tedy vstup do S fáze. Po fosforylaci pRb komplexem CCN D/CDK4/6 se E2F uvolní a spolu s transkripčními faktory DP1 a DP2 aktivují transkripci genů důležitých pro produkci DNA-replikačního aparátu buňky. Spolu s E2F se začíná tvořit komplex CCN E/CDK2, který později fosforyluje E2F faktory a tím je inhibuje. Se vzrůstající aktivitou a přiblížením ke G2 fázi je CCN E/CDK2 fosforylován a CCN E je označeno SCF komplexem k degradaci (SCF komplex je E3 ubiquitinová ligáza katalyzující ubiquitinaci proteinů určených k proteosomální degradaci, z anglického „Skp/Cullin/F-box Containing Complex“) (Basserman et al., 2014; Jung et al., 2010).

3.2 S FÁZE – G2 FÁZE

G2 zahrnuje opětovný růst buňky, replikaci organel a přípravu k samotnému rozdělení – kondenzaci chromozomů. V pozdní S fázi a na přechodu G2 fáze se, se stoupající hladinou CCN A, tvoří komplex CCN A/CDK1. Ten řídí progres S fáze a přeměnu G2/M fází fosforylací CDH1 (z ang. „*cadherin-1*“). CDH1 je adaptorový protein komplexu APC/C (z angl. „*anaphase-promoting complex*“), což je E3 ubiquitinová ligáza značící proteiny k degradaci. Fosforylací CDH1 se APC/C inhibuje. Je tak regulován vstup do mitosy přetrvávající do doby, než je v časně metafázi ubiquitin-proteosomovou dráhou zničen CCN A (Brown et al., 2015; Basserman et al., 2014).

3.3 M FÁZE

Rozdělení buňky kontroluje CDK1 a CCN B, jehož aktivace je prvotním signálem mitosy. Se vzrůstající koncentrací CCN B se fosforylací na treoninu Thr161 pomocí „*cyclin-activating kináze*“ (CAK) aktivuje CDK1. Celý tento komplex CCN B/CDK1, zodpovídající za celistvost replikované genetické informace, se začíná akumulovat již v S-fázi. Kináza WEE1/MYT1 inhibuje cyklus fosforylací CDK1 na threoninu (Thr14) a tyrosinu (Tyr15), tím se zablokuje vazebné místo pro ATP (*adenosintrifosfát*) a nástup M fáze je pozastaven. Při zvedající se hladině CCN B se ale CDK1 aktivuje a fosforyluje fosfatázu Cdc25, která odstraní inhibiční fosfáty na Thr14 a Tyr15. CCN A je pro vstup do mitosy důležitý pro svou možnost navázat se na WEE 1 a tím zeslabit inhibiční signál (Deibler et al., 2010; Tahashi et al., 2014).

Poslední kontrolní bod se vyskytuje na konci metafáze, kdy všechny chromozomy musí být správně navázány na kinetochory dělicího vřeténka. Tímto navázáním vznikne napětí, které dokáže vnímat regulační proteiny a spustí se anafáze. Po tom, co je zničen CCN A a tím uvolněn APC/C (viz G2 fáze), naváže se na tuto ligázu fosfatáza cdc20, která ji aktivuje. APC/C tak může ubiquitinovat protein securin. Jeho degradací se aktivuje proteáza separáza potřebná k oddělení sesterských chromatid. Dále se APC/C váže na cykliny S a M fáze, které označí k degradaci a tak zprostředkuje přechod do G1 fáze (Basserman et al., 2014; Oakes et al., 2014; Deibler et al., 2010; Brown et al., 2015).

3.4 CDK inhibitory

CDK inhibitory (CKI) jsou proteiny, které negativně ovlivňují funkci CDK. Některé z nich se řadí mezi tumor-supresorové geny. Mezi CKI patří *cyclin-dependant inhibitor/kináze interacting protein* (CIP/KIP) rodina, do které se řadí p21, p27, p57. A *inhibitor protein kináze 4* (INK4) rodina, do které náleží p15, p16, p18, p19.

Jedním z nejdůležitějších a nejprozkoumanějších CKI je p21. Jeho aktivita je závislá na genu *tp53* (jehož produktem je protein P53), reagujícího na poškození DNA či stárnutí buňky zvýšenou transkripcí. P21 udržuje buňky v G₀ fázi, dokud není optimální čas na dělení. Pokud je buňka vystavena růstovým faktorům, série CDK zajistí její průchod buněčným cyklem. P21 dokáže cyklus zastavit v několika bodech – navázáním na CCN D/CDK4/6 a tím zamezení fosforylaci pRb, což má za následek zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Také dokáže inaktivovat E2F, nebo se navázat na „*proliferating cell nuclear antigen*“ (PCNA, cofaktor DNA polymerázy δ při replikaci) a zamezit tak aktivaci replikační polymerázy δ a replikaci DNA, což vede k zastavení buněčného cyklu v S fázi. Při poškození DNA je p21 aktivován p53 rodinou (p53, p63, p73), RNA vážícími proteiny a také posttranslačními modifikacemi – fosforylací. P21 pak svojí vazbou inhibuje aktivitu komplexů CCN A/CDK2 a CCN B/CDK1, což má za následek zastavení buněčného cyklu. Inhibitorem proteinu p21 je transkripční faktor c-myc, který zároveň aktivuje CCN D. Po ubiquitinaci P21 v SCF se komplexy znovu aktivují (Do et al., 2015, Jung et al., 2010; Gaddameedhi et al., 2012; Basserman et al., 2014).

3.5 CHECK-POINT KINÁZY

Check-point kinázy (CHK1 a CHK2) slouží k zastavení buněčného cyklu v případě poškození vláknů DNA. Při porušení jednotlivého vlákna DNA se fosforyluje Claspin, který fosforylačně aktivuje „*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*“ (ATR) a ten tak může interagovat s CHK1. Inaktivace Claspinu probíhá ubiquitin-proteasomovou dráhou, Claspin je fosforylován „*polo-like kináze1*“ (Plk1 je kináza účastnící se mnoha pochodů v buněčném cyklu – aktivace Cdc25, aktivace APC aj.), což zajistí jeho degradaci SCF ubiquitinovou ligasou. Kontrolní bod tak může být opuštěn a buněčný cyklus pokračovat.

Přerušení dvojvlákna DNA vyvolá aktivaci „*ataxia telangiectasia mutated*“ (ATM), který fosforyluje CHK2. CHK1 a CHK2 fosforylují fosfatázu Cdc25 na serinu 216 (Ser216), což ji označí k proteasomální degradaci a zastaví tak cyklus.

Aktivita ATM-CHK2 je vyvolána přerušením dvojvlákna DNA, zatímco ATR-CHK1 aktivace následuje po přerušení jednoho vlákna DNA. Fosforylovaná CHK2 zvýší aktivitu transkripčního faktoru p53, která je v buňce stabilně udržována na nízké úrovni, ale při poškození DNA se exprese zvýší. Fosforylovaný P53 zastaví cyklus aktivací exprese inhibitorů cyklu jako je p21 a buňka má tak čas na opravu. V případě neúspěchu opravy, vyvolá p53 transkripci genů apoptického aparátu (Kang et al., 2014; Dheekollu et al., 2011).

Dalším způsobem pozastavení cyklu při poškození DNA je fosforylace WEE1, která tak dokáže inhibovat CDK1 a zastavit cyklus. To je umožněno díky inhibici Plk1, spouštěče degradace WEE1. Při poškození vlákna DNA se z RENT komplexu (z angl. „*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*“) jadérka uvolňuje fosfatáza Cdc14 (Yellman et al., 2015), která fosforyluje CDH1 a následně se tvoří komplex APC/C-CDH1. Tímto komplexem je degradován fosforylovaný Plk1 (Oakes et al., 2014; Basserman et al., 2014).

3.6 APOPTÓZA

Apoptóza je proces sloužící k odstranění poškozených buněk vyvolaný vnitřními či vnějšími faktory, např. (chemickým) poškozením DNA, UV zářením či imunitním systémem. Apoptóza je, na rozdíl od nekrózy, kde je rozpad buněk provázen zánětem, neškodná k okolním buňkám.

Aktivace apoptózy je možná mnoha odlišnými způsoby, např. vazbou ligandu na receptor (vnější cesta), mitochondriální aktivitou či vlivem endoplazmatického retikula (vnitřní cesta) atd. Dochází k aktivaci kaspáz, což jsou proteolytické enzymy, které štěpí proteiny za kyselinou asparagovou; v buňce přetrvávají jako prokaspazy a dokáží samy sebe navzájem aktivovat. Exekutorové kaspázy na konci aktivačního řetězce se váží na tzv. substráty smrti, které vyvolají kondenzaci jaderného chromatinu shlukujícího se v periferii jádra, chromozomy se uvolní a endonukleasami se fragmentuje DNA, což je typický znak apoptózy. Membrána endoplazmatického retikula se spojí s cytoplasmaticou membránou, buňka vytváří vakuoly, srašťuje se a odděluje od ostatních. Na svém povrchu vystaví molekuly, díky kterým je fagocytována.

3.6.1 VNITŘNÍ CESTA

Vnitřní cesta apoptózy je řízena z mitochondrií. Za normální okolností převládají protiapoptické faktory (např. bcl-2), které apoptóze brání. Ale např. při poškození DNA mohou převládnout proapoptické faktory (p53, bax atd.), což vede ke zvýšené propustnosti membrány mitochondrie. Do cytosolu se vylije cytochrom c, který navázáním na cytoplasmatický protein APAF-1 (z angl. "apoptotic protease activating factor") formuje apoptozóm, jenž se váže na prokaspázu 9 a aktivuje ji. Spolu s cytochromem c se uvolní také protein SMAC (z angl. "second mitochondria-derived activator of caspases"). Ten se váže na inhibitor apoptických proteinů (IAP) inhibující kaspázu 9 a tím je umožněna aktivace signální kaskády apoptózy. Kaspáza 9 aktivuje konečné kaspázy 3, 6 a 7, které zahájí samotný proces podnícením fragmentace DNA endonukleázou CAD („kaspázou aktivovaná DNáza“).

Důležitým faktorem proapoptické dráhy je protein p53. Jeho hladina je ve zdravé buňce držena na nízké úrovni pomocí MDM2 E3 ubiquitinové ligázy (z angl. „*Mouse double minute 2 homolog*“). Tato MDM2 ligáza ho ubiquitínuje, p53 se přemístí z jádra do cytoplasmy a zde je degradován v proteasomu. Při poškození vlákna DNA je p53 fosforylován pomocí kináz ATR či ATM, což inhibuje funkci MDM2 ligázy a p53 aktivuje inhibitory cyklu jako je p21, čímž zahájí reparaci či apoptózu buňky. Nedostatečná funkce tohoto proteinu vede k hromadění chyb poškození DNA, které mohou vést až k rozvoji nádorového bujení (Nag et al., 2013).

Geny rodiny Bcl-2 jsou klíčovými geny apoptózy. Na rozdílné podněty přicházející z vnější strany mitochondriální membrány odpovídají buďto aktivací či inhibicí apoptózy a to regulací propustnosti mitochondriální membrány. Homodimer Bcl-2 apoptóze brání, homodimer Bax ji aktivuje. Při proapoptickém signálu mění proapoptické proteiny v cytoplasmě svou konformaci, přemístí se k membráně mitochondrií a vytvoří dimery Bcl-2/bax, čímž inhibují funkci Bcl-2 a membrána se tak stane propustnou. Citlivost k proapoptickým signálům určuje poměr proteinů. Bcl-2 i Bax se mohou navázat na cytochrom c a blokovat jeho aktivitu. Bcl-2 se váže i na komplex bílkoviny obsahující tumor-supresorový protein p53 a brání jeho přemísťování v jádře – blokuje jeho funkci. Na membráně mitochondrií se pak Bcl-2 váže na proteinkinasu Raf-1 a ta tak nemůže fosforylovat cílový protein (např. Bad s proapoptickou funkcí, čímž je zabráněno apoptóze) (Megyesi et al., 2016; Alabsi et al., 2016).

3.6.2 VNĚJŠÍ CESTA

Od vnitřní cesty se liší modulátorem, kterým je zde tzv. receptor smrti, na rozdíl od vnitřní, kde tuto roli zastává cytochrom c. Receptory smrti patří mezi TNF receptory („*faktor nádorové nekrózy*“), které se účastní buněčného růstu a smrti. Jedním z nich je i transmembránový FAS receptor, na který se váže FAS ligand exprimovaný T-lymfocyty. Receptory smrti, včetně FAS receptoru, se vyznačují tím, že ve své cytosolové části obsahují tzv. doménu smrti, na kterou se váže adaptorový protein FADD („*Fas-Associated protein with Death Domain*“) a dále i prokaspáza 8. Společně utvoří DISC („*death inducing signaling complex*“), který aktivuje efektorové kaspázy 3, 6 a 7 směřující buňku k apoptóze (Yang et al., 2015).

3.7 NÁDOROVÉ BUJENÍ

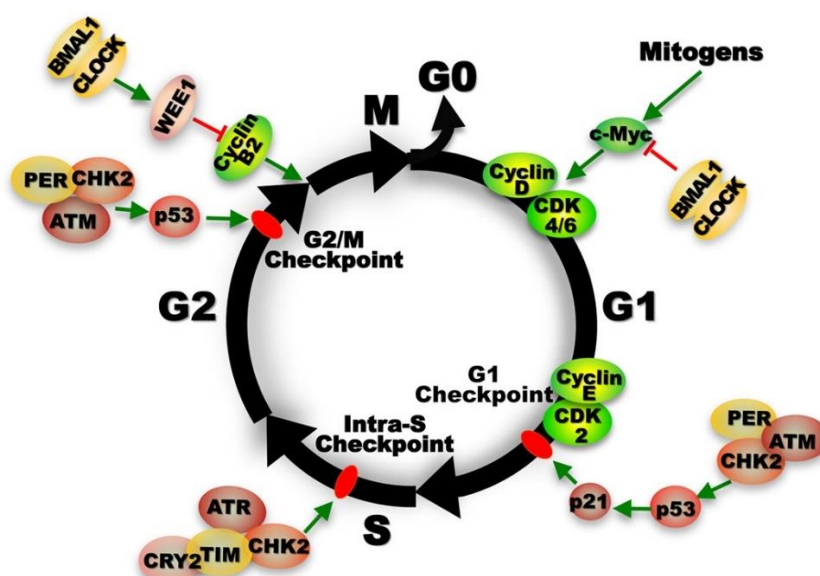
Vznik nádorového bujení je mnoho-krokový proces, v jehož důsledku se buňka začne nekontrolovatelně množit. To může být způsobeno jak vnějšími, tak genetickými faktory.

Obvykle jde o postižení genu jedné buňky, označujeme je tedy souhrnně jako monoklonální choroby.

Existují 4 základní skupiny podílející se na životaschopnosti buněk. Mezi ně patří protoonkogeny (podporují proliferaci, jsou dominantní, např.: c-myc a CCN E), supresorové geny (inhibují růst, jsou recesivní, např.: pRb a p53), geny podporující apoptózu (dominantní) a geny řídící reparaci DNA. Nádorové buňky jsou díky genetickým změnám schopné žít déle a unikat apoptóze.

4 INTERAKCE BUNĚČNÉHO CYKLU A CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ

Cirkadiánní hodiny ovlivňují buněčný cyklus na molekulární úrovni dvěma způsoby a to za 1) transkripce hodinami kontrolovaných genů či za 2) interakcí proteinů kódovaných hodinovými geny s proteiny buněčného cyklu (obr. 3).



Obrázek 3 – Přechod mezi fázemi buněčného cyklu je regulován interakcí proteinů buněčného cyklu s proteiny hodinami kontrolovaných genů (c-myc, Wee1, ATM, ATR). C-Myc aktivuje CCN D, který spolu s CDK4/6 tvoří komplex zodpovědný za progrese G1 fáze. Přeměnu G1/S fází umožní komplex CCN E/CDK2. Při poškození dvojvlákna DNA zastaví PER1 cyklus navázáním na ATM/CHK2, aktivuje se p53 a p21, který inhibuje CDK2. S fáze může být při poškození DNA pozastavena komplexem ATR/CHK2, který je aktivován komplexem CRY2/TIM. Dvojitě poškození vlákna DNA v G2 fázi má za následek interakci PER a ATM/CHK2 a aktivaci p53 zastavujícího cyklus. BMAL1/CLOCK aktivuje WEE1, která inhibuje CCN B2 důležitý v přeměně G2/M fází (Fu et al., 2013)

Buněčný cyklus je těmito cestami ovlivňován mnoha různými proteiny a stále se nacházejí nové interakce a propojení cirkadiánních hodin s proliferací buněk. Není proto divu, že desynchronizace cirkadiánního systému může mít na život buňky zásadní vliv a v mnoha případech i způsobit její přeměnu na buňku nádorovou.

4.1 P21

P21 jakožto CKI má důležitou roli v zastavení buněčného cyklu například při poškození DNA. Pokud je DNA poškozena, aktivuje se pomocí p53 transkripce p21 a ten tak může inhibovat CDK2 a dále se váže na PCNA a inhibuje tak DNA replikaci. Gréchez-Cassiau a její tým (2008) zjistili, že myši s genetickou delecí *Bmal1* (*Bmal1*^{-/-}) postrádají cirkadiánní rytmus v expresi P21, který ve svém promotoru sice neobsahuje E-box, ale má RORE sekvence. Zjistili tedy, že rytmicita exprese P21 je ovlivněna antagonistickým efektem REV-ERB α , který jeho expresi potlačuje, zatímco ROR α zvyšuje jeho hladinu (Gréchez-Cassiau et al., 2008). Tento nález ukazuje, že cirkadiánní systém řídí expresi jednoho z důležitých regulačních faktorů buněčného cyklu tak, že zvyšuje jeho přirozenou hladinu v době dne, a posouvá tak citlivou fázi replikace DNA na noční dobu, kdy hrozí menší poškození DNA UV zářením.

4.2 TIM

Protein „*timeless*“ (TIM) je důležitým regulátorem buněčného cyklu účastní se odpovědi na poškození DNA, přičemž TIM null myší embrya nejsou schopná života. Jeho hladiny jsou nejvyšší v S, G2 a M fázích (Ünsal-Kaçmaz et al., 2005).

V S fázi tvoří TIM komplex s „*timeless interacting protein*“ (TIPIN). Tento komplex má velký význam v kontrole replikace DNA a její opravě po poškození. Interakce TIPINu a „*replikačního proteinu A*“ (RPA) specificky zprostředkovává fosforylaci CHK1 přes ATR. RPA stabilizuje komplex TIM/TIPIN (Kemp et al., 2010). Odstranění TIM/TIPIN komplexu vedlo k chybám v opravě poškozené DNA a také uvolnění chromatidových spojů s následnými chybami v M fázi (Leman et al., 2010)

V M fázi spolupracuje TIM s mitotickými strukturami – byl nalezen v komplexu s CDK1 i kinázou Plk1, na které se přímo váže. Snížená exprese TIMu měla za následek mnohačetné defekty v mitose, mezi něž patří ztráta koheze chromatid, ztráta vřetenovitého tvaru a nemožnost postoupení z mitosy do G1 fáze. Plk1 je zapojen do odpovědi na poškození DNA – stabilizuje Claspin při poškození DNA (Dheekollu et al., 2011).

Zařazení savčího TIMu mezi hodinové proteiny je trochu komplikované – má velkou sekvenční shodu s TIMem drosophily (dTIM), který vykazuje cirkadiánní oscilaci a tak se původně mělo za to, že jde o cirkadiánní hodinový protein (Benna et al., 2000). V savčích buňkách interaguje s CRY, ale nemá cirkadiánní oscilaci jako dTIM. Jeho genetická delece způsobuje letalitu embryí, což delece jiných hodinových genů (*Clock*, *Bmal1* atd.) nezpůsobuje

(Gotter et al., 2000). Zjistilo se ale, že savčí TIM má dvě formy a to kratší (sTIM) a delší (ITIM). Funkce sTIM není zatím plně objasněna a není jasné, jestli je tato forma vytvářena alternativním sestřihem nebo přídavným iniciačním úsekem transkripce. Cirkadiánní oscilace jeho transkripce pozorována nebyla, zatímco ITIM se vyskytuje v SCN a cirkadiánní rytmicitu vykazuje (Engelen et al., 2013).

Aktivita ITIM je hodinami řízená přes interakci s C-koncem CRY, kde se vyskytují coiled-coil domény (CCD), čímž se také liší od dTIM. Díky této přidané doméně je možná jeho interakce s jinými proteiny, zatímco u drosophily byla jeho funkce spíše přijímat světelný signál. O navázání na tuto doménu soutěží ITIM s PER, přičemž PER má ke CRY vyšší afinitu (Ünsal-Kaçmaz et al., 2005; Engelen et al., 2013).

Zvýšená exprese TIM se dá pozorovat v různých typech nádorového bujení a je spojována s pozdějšími stádii nádorů a horší prognózou, např. při rakovině prsu nebo tlustého střeva. Snížená exprese TIM je spojována se sníženou proliferací, poruchami v opravě DNA, následným zkracováním telomer a defekty v M fázi (Mao et al., 2013).

4.3 WEE1

Kináza WEE1 byla objevena v poltivé kvasince, kde deficit WEE1 vedl k předčasnému vstupu do mitosy a replikaci nedozrálých buněk (Russel et al., 1987).

Expres WEE1 je aktivována přes E-box pomocí BMAL1/CLOCK (nebo BMAL1/NPAS) a pozastavuje ji PER/CRY, což bylo potvrzeno výzkumem Matsua a jeho kolegů (2003) na CRY-deficientních myších. Kináza WEE1 je inhibítozem buněčného cyklu a při poškození DNA společně s MYT1 fosforyluje Tyr15 místo na CDK1. To má za následek zastavení buněčného cyklu v G2/M a inhibici proliferace, čímž je kontrolován vstup do M fáze a také DNA replikace v S fázi (Do et al., 2013).

Soták a kolektiv (2013) prováděli pokusy na myších s chemicky indukovaným nádorem tlustého střeva. Zjišťovali, zda byla ovlivněna exprese hodinami kontrolovaných genů a zaměřili se mimo jiné na WEE1. Tato kináza sice nevykazovala žádnou rytmicitu, ale její hladina byla v průměru zvýšená oproti kontrolám. Tyto výsledky byly získány z experimentů na myších ve stáří 52 týdnů, zkusili tedy testy zopakovat na 10 týdnů starých myších a u nich rytmické zvyšování hladiny zaznamenali. Z výsledků tedy není jasné, jestli rytmicita kinázy WEE1 se v tumoru tlustého střeva nevytrácí spíše s přibývajícím věkem pokusných myší (Soták et al., 2013). V každém případě má změna míry exprese WEE1 závažné následky pro buněčnou proliferaci.

Například, studie Kima a kolegů (2016) se zaměřovala na dopad zvýšené exprese WEE1 v žaludečních nádorových buňkách. Při odstranění WEE1 došlo ke snížení proliferace, migrace metastáz a invazivity nádoru. Naopak zvýšená hladina WEE1 tyto pochody podpořila (Kim et al., 2016). Zvýšená hladina WEE1 je také spojována s vývojem maligního melanomu, rakoviny prsu, osteosarkomu, glioblastomů a hepatocelulárního karcinomu (Magnussen et al., 2012; Murrow et al., 2010; Kreahling et al., 2013; Mueller et al., 2014; Massard et al., 2011). Vzhledem k regulaci exprese WEE1 dimérem CLOCK/BMAL1, jež podléhá zpětné inhibici komplexem PER/CRY, může být proces vzniku nádoru ovlivněn i hladinou PER/CRY během cirkadiálního dne. Nižší hladiny PER/CRY, např. v důsledku práce na směny, způsobí nedostatečnou inhibici aktivity CLOCK/BMAL1, tedy i transkripce kinázy WEE1, a tím naruší správný běh buněčného cyklu. Pokud by se dala aktivita této kinázy blokovat, mohlo by se toho využít v cílené léčbě rakoviny. Jedním ze způsobů je například blokáda selektivním inhibitorem WEE1 kinázy MK-1775, který dokáže vyvolat mitotickou katastrofu, období apoptózy způsobenou nemožností aktivace CCN B a Cdk1. MK-1775 je tak schopný zabránit růstu tumoru. Jeho použití při léčbě rakoviny je nyní zkoumáno a testováno (Do et al., 2015; Tamura et al., 2015).

4.4 C-MYC

C-myc hraje v proliferaci klíčovou roli jako bHLH (helix-loop-helix) transkripční faktor regulující několik genů kritických pro G1/S přeměnu. Snižuje hladiny p21 a zvyšuje CCN D1. Zahajuje tak růst buňky, proliferaci a za určitých podmínek i apoptózu. Gen pro c-myc obsahuje E-box, na který se váže BMAL1/CLOCK(NPAS2), který tak spouští jeho transkripci podle denního rytmu. Dále se do jeho promotorové oblasti může navázat p53, který naopak transkripci c-myc potlačuje. Proti vazbě p53 se c-myc může bránit navázáním inhibitoru histonové deacetylázy trichostatinu A. Hladiny c-myc jsou vyšší v časně tmavé fázi dne a nižší v časně světlé fázi dne (Karantanos et al., 2014; Okazaki et al., 2010; Ho et al., 2005).

Karantanos s kolegy zkoumali vliv narušeného cirkadiálního systému na expresi c-myc. Myši s genetickou delecí *Per1*, vykazovaly sníženou expresi c-myc a to vedlo ke zvýšené transkripci CCN D1, což znamenalo zvýšenou proliferaci. Zvýšená exprese *Per2* v leukemických buňkách zase vedla ke snížení hladin c-myc a CCN B1, to potlačilo buněčnou proliferaci a vedlo k apoptóze (Karantanos et al., 2014).

Na základně svých poznatků označili Fu a jeho kolegové (2002) *mPer2* jako tumor supresorový gen. Při svém výzkumu na myších zjistili, že genetická delece genu *Per2* vede ke

zvýšené citlivosti na radiační záření a vede k významně většímu riziku vzniku nádoru z ozáření. Zároveň je znemožněna p53 indukovaná apoptóza (Fu et al., 2002).

Okazaki se svým týmem (2010) zkoumali možnosti využití transferinových receptorů 1 (TfR1) na myších s rakovinou tlustého střeva k léčbě tumoru. Studie s luciferázovým reportérem na genu c-myc ukázala, že hodinami kontrolovaný c-myc svou vazbou na E-box v promotorové sekvenci TfR1 dokáže zvýšit jeho hladiny (při snížení hladiny c-myc byla zároveň i amplituda TfR1 nižší). TfR1 vykazoval 24hodinovou oscilaci ve zdravých i maligních buňkách, přičemž v maligních byla jejich exprese zvýšená. Protože se TfR1 pomocí transferinu účastní vpravování železa do buňky, zajímali se, jestli by bylo možné pomocí těchto receptorů vnést i jiné látky. Upravený „*Tf-coupled polyethylene glycol*“ liposom je schopný navázat se na TfR1 tumorových buněk, které ho poté endocytují. Pomocí takto upravených liposomů je možné do maligních buněk vnést cytotoxická agens. A právě toho by, podle Okazakiho týmu, mohlo být využito v léčbě rakoviny (Okazaki et al., 2010).

Deregulace cirkadiánního rytmu v transkripci c-myc může podnítit nesprávně načasovanou proliferaci, ztrátu konečné diferenciace nebo zrušit zastavení cyklu při poškození DNA (Ho et al., 2005).

4.5 PER

Period rodina zahrnuje PER1 a PER2, které jsou součástí cirkadiánních hodin, a PER3, jehož funkce v hodinovém cyklu nebyla potvrzena a patří spíše mezi hodinami kontrolované geny.

PER proteiny kromě zpětnovazebné smyčky v cirkadiánních hodinách zaujímají funkci regulátorů buněčného cyklu. Přes interakci s ATM a následné aktivaci CHK2 se zapojují do kontrolního bodu a řídí tak nepřímo proliferaci buňky. Nestabilita v hladině PER může vést k rozvoji nádoru či apoptóze buňky, jak dokazuje mnoho doposud provedených výzkumů (Liu et al., 2014; Zhao et al., 2014; Oshima et al., 2011; Lee et al., 2010).

Interakcí PER1 a buněčného cyklu na lidských nádorových buňkách se ve své studii zabýval Gery se svou skupinou (2006). Zvýšená exprese *Per1* v jejich výzkumu vedla ke zvýšení hladiny c-myc a potlačení p21, což mělo za následek vznik apoptózy. Zároveň byly zvýšené hladiny p53 a konstitutivně aktivovaná CHK2. Inhibice *Per1* naopak procento apoptických buněk snížila. Jejich výzkum naznačil, že protein PER1 má svou úlohu v aktivaci ATM a jejich výsledky podpořili význam cirkadiánní regulace buněčného cyklu a hypotézu, že narušení hodinového cyklu může vést k rozvoji rakoviny (Gery et al., 2006).

Yeh a jeho kolegové (2005) zkoumali vliv PER1 na vznik karcinomu endometria. 35 vzorků od pacientek s karcinomem děložní sliznice srovnávali se zdravými tkáněmi. Ve vzorcích s nádory byly hladiny PER1 sníženy. Pomocí mutační a metylační analýzy promotorových oblastí přišli na to, že snížená exprese *Per1* je částečně způsobena metylací DNA promotoru *Per1*. Nenašli ovšem přímý vztah mezi expresí PER1 a P53, c-myc, CCN A, CCN B nebo CCN D1. Snížení PER1 ovšem narušilo cirkadiánní hodiny, což vytvořilo výhodnější podmínky pro buňky endometriálního karcinomu a ty se tak rozrostly (Yeh et al., 2005).

Do s kolegy zkoumali vliv PER1, PER2 a PER3 na nádorové buňky prsu u tchajwanských žen a zjistili, že v 95 % případů byla exprese těchto genů porušená v porovnání s nerakovinnými buňkami. Tyto změny byly opět spojené s metylací *Per1* a *Per2* promotoru. *Per1* měl v 50 % případů promotor metylovaný, což je vedlo k závěru, že inaktivace *Per1* může hrát důležitější roli v nádoru prsu (Do et al., 2005).

Huova skupina porovnávala expresi *Per2* v myším Lewisově karcinomu plic (LKP) a rakovině prsu a kontrolou sestávající ze zdravých buněk s vneseným prázdným plasmidem. Vyšší exprese *mPer2* u LKP myší a v nádoru prsu vedla k redukci buněčné proliferace, změněné expresi genů spojených s apoptózou a apoptóze. Hladiny c-myc zde byly sníženy, zatímco exprese p53 byla zvýšena. Jejich výsledky ukazují, že cirkadiánní gen *mPer2* může hrát důležitou roli v tumorové supresi navozením apoptózy. Zvýšená exprese *mPer2* může podnítit apoptózu nádorových buněk vnitřní cestou, skrz p53 a c-myc, který je pomocí p53 potlačen (Hua et al., 2006).

V nádorových buňkách tlustého střeva byly, v porovnání se zdravými buňkami sliznice, hladiny *Per1*, *Per2* i *Per3* sníženy, jak vypovídá výzkum Sotáka s kolektivem a potvrzuje výzkum Wangovy skupiny. V okolí nádoru se rytmicita zachovala. Pacienti s nižší expresí *Per1* a *Per3* také vykazovali nižší míru přežití (Soták et al., 2013; Wang et al., 2016).

Im se skupinou zkoumali význam PER3 a zjistili, že nemá funkci v udržení hodinové smyčky. Má ale svou funkci v buněčném cyklu – interaguje s ATM a ovlivňuje tak CHK2. Inhibice *Per3* téměř kompletně znemožnila aktivaci CHK2 po poškození DNA. Zvýšená exprese *Per3* naopak podnítila aktivaci CHK2 i bez poškození DNA a vedla k inhibici proliferace a apoptóze. Tato zjištění ukazují, že PER3 se účastní kontrolního bodu, buněčné proliferace a apoptózy (Im et al., 2010).

Zatímco zvýšené hladiny proteinů PER vedou ke zvýšené apoptóze, snížené hladiny mají často za následek rozvoj rakoviny. Cíleného zvýšení exprese PER v nádoru by se mohlo využít

v léčbě nádoru. PER3 je oproti PER1 a PER2 specifický – nemá roli cirkadiánního regulátoru, ale je důležitou součástí buněčného cyklu.

4.6 XPA

Odpověď buňky na poškození DNA UV zářením může probíhat na úrovni globální genomové opravy (odstranění poškozené DNA z celého genomu), nebo rychlejší cestou transkripčně vázané opravy (oprava poškozené DNA aktivně transkribovaného vlákna) (Riedl et al., 2003). To je zajištěno pomocí ATR, které aktivuje nukleotidovou excizní opravu (NER) sestávající z 6 opravných faktorů (XPA, XPC, XPG, XPF-ERCC1, RPA a TFIIH). Ty odstraní poškozené místo, vzniklá mezera je přepsána DNA polymerázou a DNA ligasou připojena ke zbytku řetězce (Wu et al., 2007).

Do buněčného cyklu je XPA zapojen interakcí s ATR, které se aktivací při poškození DNA svou fosforylační částí naváže na α -helix v helix-turn-helix struktuře XPA. To indukuje NER opravu jak globální genomovou tak transkripčně vázanou. Když Wu se svým týmem zablokovali interakci ATR s XPA v jádře, byla účinnost opravy DNA po ozáření UV světlem snížena. Zjistili tak, že kinázová aktivita ATR je potřebná k translokaci cytoplasmatického XPA do jádra (Wu et al., 2007; Steven et al., 2009). Translokace XPA do jádra je závislá jak na ATR, tak i na p53 a fázi buněčného cyklu. V G1 a G2 fázi nemělo UV záření ani p53 na translokaci XPA vliv – v G1 fázi zůstávala většina XPA v cytoplasmě, v G2 fázi naopak v jádře. V S fázi ovšem stimulovalo UV záření (a s tím spojené poškození DNA) transport XPA do jádra v závislosti na fosforylaci p53. Inhibice p53 pak tuto translokaci nedovolila (Li et al., 2011).

Kang se svým týmem zjistili, že NER má 6x vyšší aktivitu během dne. Pokus zopakovali v konstantní tmě s cílem určit, zda se jedná o endogenně řízenou oscilaci, což potvrdili – oscilace byla během subjektivního dne zvýšená, přičemž XPA byl jediný oscilující NER, navíc vykazující rytmus se stejnou fází jako BMAL1 a opačnou ke CRY a PER. To je vedlo k domněnce, že je regulován právě tak jako BMAL1. Pokusy na CRY deficientních myších ukázaly, že XPA je opravdu kontrolovaný cirkadiánními proteiny, neboť u nich byla hladina XPA zvýšená, stejně tak jako hladina BMAL1, což bylo způsobeno ztrátou negativní zpětné vazby PER/CRY (Kang et al., 2009).

XPA vykazoval cirkadiánní rytmus s maximem v 5 hodin odpoledne a nejnižší transkripci kolem 5. hodiny ranní. K cirkadiánní oscilaci XPA přispívá i jeho posttranslační úprava HERC2 ubiquitinovou ligasou („*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*“). XPA

má podobný poločas rozpadu (cca 3 hodiny) jako CRY. Kangův tým se proto domníval, že je také terčem E3 ligasy jako CRY a našli právě HERC2, který se specificky váže na XPA a ubiquitínuje ho, což vede k degradaci. Cirkadiánní oscilaci XPA není možné pozorovat ve varlatech, zatímco játra ji vykazují (Kang et al., 2010).

Cisplatin je složka chemoterapeutik, která zabíjí nádorové buňky. Používá se hlavně u nádorů vaječníků a varlat, dále i u karcinomu v oblasti hlavy, krku, plic, žaludku a tlustého střeva. Nádorové buňky zabíjí zničením jejich DNA. Je tedy důležitá následná oprava. Na to se zaměřil Kang s kolegy v jedné své studii na myších játrech a varlatech. Zjistili, že XPA hraje základní úlohu v opravě cisplatinem zničené DNA a jeho hladina i zvýšení opravné aktivity může být regulováno změnou hladiny HERC2. Časování léčby na dobu, kdy je aktivita XPA vysoká, by tak, díky jeho roli v opravě DNA, mohlo pomoci k rychlejší regeneraci po chemoterapii. S ohledem na četnost využívání cisplatinu v léčbě nádorů by se jednalo o ulehčení jak mnoha pacientům, tak i lékařům.

4.7 VLIV SVĚTLA

Narušení cirkadiánního systému prací na směny, nočním osvětlováním či častým cestováním skrz časová pásma může vést k rozvoji nádorového bujení. Výzkum na myších s Glasgow osteosarkomem, které byly vystaveny jet lagu, ukázal, že oscilace *mPer1* v SCN byla změněna ve prospěch růstu tumoru (Filipski et al., 2004). Několik studií na ženách pracujících na směny odhalilo zvýšené riziko rakoviny prsu při práci na směny (Benabu et al., 2015; Lin et al., 2015; Papantoniou et al., 2015). Mezi nejznámější patří studie Schernhammerové, která se svým týmem dotazovala 78 562 zdravotních sester pracujících na směny s četností nejméně 3x týdně. Sestry pracující na směny 1 rok až 29 roků měly 8% nárůst rizika rakoviny prsu, zatímco ženy pracující přes 30 let měly 36% rizikovost (Schernhammer et al., 2001). Nižší výskyt rakoviny je pak naopak pozorován u slepých lidí se stálou hladinou melatoninu (Feychting et al., 1998) a fyziologické hodnoty melatoninu zase zastavily růst tumoru v *in vitro* pokusech Blaskova týmu (Blask et al., 1997). Všechny tyto studie naznačují důležitost denních rytmů v regulaci buněčných dějů a s tím i souvislost s rozvojem rakoviny.

5 ZÁVĚR

Cirkadiánní systém je s buněčným cyklem propojen na více úrovních a je kontrolován jak hodinovými, tak i hodinami-kontrolovanými proteiny. Ty řídí správný průchod jednotlivými fázemi i načasování samotného dělení. Mnohé nové výzkumy poukazují na důležitost funkčnosti samotných hodin i tohoto propojení v tvorbě nádorů. Podle studií uvedených v této práci je regulace cirkadiánním systémem v určitých nádorových tkáních porušená – hodnoty hodinových proteinů jsou zvýšené či snižené a tím je znemožněna další regulace buněčného cyklu jako je jeho zastavení v kontrolním bodu při poškození DNA, samotná oprava DNA či apoptóza. Buňka ztrácí kontrolu z vnějšku a může se stát buňkou nádorovou. To může být ovlivněno jak vnějšími stimuly jako je práce na směny či noční svícení, tak také s věkem se amplituda hladin hodinových proteinů snižuje a účinnost cirkadiánního systému klesá. Tyto poznatky mohou pomoci k přesnějšímu poznání mechanismu vzniku nádoru, jejich léčbě a prevenci. Dále se také rozvíjí obor chronoterapie, při které se využívá podávání léku v určitou denní dobu, což může zvýšit jeho účinnost či snížit vedlejší účinky.

6 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E. (2002). Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kináze I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in cultured cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(6), 1693–1703
- Alabsi, A. M., Lim, K. L., Paterson, I. C., Ali-Saeed, R., Muharram, B. A. (2016). Cell cycle arrest and apoptosis induction via modulation of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase dependence in dracaena cinnabari-treated h400 human oral squamous cell carcinoma. *BioMed Research International*, 2016, 4904016.
- Andrietta, M. H., Eloy, N. B., Hemerly, A. S., Ferreira, P. C. G. (2001). Identification of sugarcane cDNAs encoding components of the cell cycle machinery. *Genetics and Molecular Biology*, 24(1-4), 61-88.
- Baldwin, G. S. (2009). Phosphorylation of cyclin-dependent kináze 2 peptides enhances metal binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(1), 151–154.
- Bassermann, F., Eichner, R., Pagano, M. (2014). The ubiquitin proteasome system – Implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(1).
- Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J., Dulić, V. (2003). Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *The EMBO Journal*, 22(15), 3992–4002.
- Bedont, J. L., Blackshaw, S. (2015). Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, 74.
- Benabu, J. C., Stoll, F., Gonzalez, M., Mathelin, C. (2015). Night work, shift work: breast cancer risk factor?. *Gynecol Obstet Fertil*, 43(12), 791-799.
- Benna, C., Scannapieco, P., Piccin, A., Sandrelli, F., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C. P., Valle, G., Costa, R. (2000). A second timelless gene in drosophila shares greater sequence similarity with mammalian TIM. *Current Biology*, 10(14), 512-513.
- Blask, D. E., Wilson, S. T., Zalatan, F. (1997). Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. *American Association for Cancer Research*, 57(10), 1909-1914.

- Boundless (2016). Boundless Biology <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-reproduction-10/control-of-the-cell-cycle-89/regulator-molecules-of-the-cell-cycle-399-11626/>
- Brown, N. R., Korolchuk, S., Martin, M. P., Stanley, W., Moukhametzianov, R., Noble, M. E. M., Endicott, J. A. (2015). CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nature Communications*, 6, 6769.
- Cao, R., Zhang, J., Zhang, M., Chen, X. (2015). PPM1D regulates p21 expression via dephosphorylation at serine 123. *Cell Cycle*, 14(4), 641–647.
- Crumbly, C., Burris, T. P. (2011). Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS ONE*, 6(3), e17290.
- Deibler, R. W., Kirschner, M. W. (2010). Quantitative reconstitution of mitotic CDK1 activation in somatic cell extracts. *Molecular Cell*, 37(6), 753–767.
- Dheekollu, J., Wiedmer, A., Hayden, J., Speicher, D., Gotter, A. L., Yen, T., Lieberman, P. M. (2011). Timeless links replication termination to mitotic kinase activation. *PLoS ONE*, 6(5), e19596.
- Do, K., Doroshov, J. H., Kummar, S. (2013). Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*, 12(19), 3159–3164.
- Do, K., Wilsker, D., Zlott, J., Freshwater, T., Kinders, R. J., Collins, J., Chen, A. P., Doroshov, J. H., Kummar, S. (2015). Phase I study of single-agent AZD1775 (MK-1775), a WEE1 kinase inhibitor, in patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol*, 33(30), 3409-3415.
- Engelen, E., Janssens, R., C., Yagita, K., Smits, V., A., J., van der Host, G., T., J., Tamanini, F. (2013). Mammalian TIMELESS is involved in period determination and DNA damage-dependent phase advancing of the circadian clock. *PLoS One*, 8(2), e56623.
- Feillet, C., van der Horst, G. T. J., Levi, F., Rand, D. A., Delaunay, F. (2015). Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: implication for healthy cells and malignant growth. *Frontiers in Neurology*, 6, 96.
- Feychting, M., Osterlund, B., Ahlbom, A. (1998). Reduced cancer incidence among the blind. *Epidemiology*, 9(5), 490-494.

- Filipski, E., Delaunay, F., King, V. M., Wu, M. W., Claustrat, B., Gréchez-Cassiau, A., Guettier, C., Hastings, M. H., Francis, L. (2004). Effects of chronic jet lag on tumor progression in mice. *Cancer Research*, 64(21), 7879-7885.
- Filipski, E., Innominato, P. F., Wu, M., Li, X., Iacobelli, S., Xian, L., Lévi, F. (2005). Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *Journal of the National Cancer Institut*, 97(7), 507-517.
- Fu, L., Kettner, N. M. (2013). The circadian clock in cancer development and therapy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 119, 221–282.
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., Lee, Ch. Ch. (2002). The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo*. *Cell*, 111(1), 41-50.
- Fuhr, L., Abreu, M., Pett, P., Relógio, A. (2015). Circadian systems biology: When time matters. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 417–426.
- Gaddameedhi, S., Reardon, J. T., Ye, R., Ozturk, N., Sancar, A. (2012). Effect of circadian clock mutations on DNA damage response in mammalian cells. *Cell Cycle*, 11(18), 3481–3491.
- Gery, S., Komatsu, N., Baldjyan, L., Yu, A., Koo, D., Koeffler, P. (2006). The circadian gene Per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Molecular Cell*, 22, 375-382.
- Gotter, A. L., Manganaro, T., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F. Jr., Possidente, B., Sriram, S., MacLaughlin, D. T., Reppert, S. M. (2000). A time-less function for mouse timeless. *Nature Neuroscience*, 3(8), 755-756.
- Gréchez-Cassiau, A., Rayet, B., Guillaumond, F., Teboul, M., Delaunay F. (2008). The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283(8), 4535–4542.
- Gu, X., Xing, L., Shi, G., Liu, Z., Wang, X., Qu, Z., Xu, Y. (2012). The circadian mutation PER2S662G is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*, 19(3), 397–405.
- Guertin, A. D., Li, J., Liu, Y., Hurd, M. S., Shuller, A. G., Long, B., Hirsch, H. A., Feldman, I., Benita, Y., Toniatti, C., Zawel, L., Fawell, S. E., Gilliland, D. G., Shumway, S. D. (2013). Preclinical

- evaluation of the WEE1 inhibitor MK-1775 as single-agent anticancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 12(8), 1442-1452.
- Hamaguchi, H., Fujimoto, K., Kawamoto, T., Noshiro, M., Maemura, K., Takeda, N., Kato, Y. (2004). Expression of the gene for Dec2, a basic helix–loop–helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochemical Journal*, 382(1), 43–50.
- Hansen, J. (2001). Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1513-1515.
- Ho, J. S. L., Ma, W., Mao, D. Y. L., Benchimol, S. (2005). p53-dependent transcriptional repression of C-Myc is required for G1 cell cycle arrest. *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), 7423–7431.
- Hogenesch, J. B. (2009). It's all in a day's work: Regulation of DNA excision repair by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2481–2482.
- Hua, H., Wang, Y., Wan, C., Liu, Y., Zhu, B., Yang, C., Halberg, F. (2006). Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer Science*, 97(7), 589–596.
- Chen, C. R., Wang, W., Rogoff, H. A., Li, X., Mang, W., Li, C. J. (2005). Dual induction of apoptosis and senescence in cancer cells by CHK2 activation: checkpoint activation as a strategy against cancer. *Cancer Research*, 65(14), 6017-6021.
- Chen, S. T., Ch, K. B., Hou, M. F., Yeh, K. T., Kuo, S. J., Chang, J. G. (2005). Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis*, 26(7), 1241-1246.
- Im, J. S., Jung, B. H., Kim, S. E., Lee, K. H., Lee, J. K. (2010). Per3, a circadian gene, is required for CHK2 activation in human cells. *FEBS Lett*, 584(23), 4731-4734.
- Jolley, C. C., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Ueda, H. R. (2014). A mammalian circadian clock model incorporating daytime expression elements. *Biophysical Journal*, 107(6), 1462–1473.
- Jung, Y. S., Qian, Y., Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling*, 22(7), 1003–1012.

- Kang, T. H., & Leem, S. H. (2014). Modulation of ATR-mediated DNA damage checkpoint response by cryptochrome 1. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4427–4434.
- Kang, T. H., Lindsey-Boltz, L. A., Reardon, J. T., Sancar, A. (2010). Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 4890–4895.
- Kang, T. H., Reardon, J. T., Kemp, M., Sancar, A. (2009). Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2864–2867.
- Karantanos, T., Theodoropoulos, G., Pektasides, D., Gazouli, M. (2014). Clock genes: Their role in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(8), 1986–1992.
- Kemp, M., G., Akan, Z., Yilmaz, S., Grillo, M., Smith-Roe, S., L., Kang, T., H., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W., K., Abraham, R., T., Sancar, A., Ünsal-Kacmaz, K. (2010). Tipin-replication protein a interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress. *J Biol Chem*, 285(22), 16562-16571.
- Kim, H. Y., Cho, Y., Kang, H., Yim, Y. S., Kim, S. J., Song, J., Chun, K. H. (2016). Targeting the WEE1 kináze as a molecular tardeted therapy for gastric cancer. *Oncotarget*.
- Kliewer S. A., Lehmann J. M., Willson T. M. (1999). Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science*, 5415(284), 757–760.
- Ko, C. H., Takahashi, J. S. (2006), Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15, 271-277.
- Kojima, S., Green, C. B. (2015). Analysis of circadian regulation of poly(A) tail length. *Methods in Enzymology*, 551, 387–403.
- Kondratova, A. A., Kondratov, R. V. (2012). Circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(5), 325–335.
- Kreahling, J. M., Foroutan, P., Reed, D., Martinez, G., Razabdouski, T., Bui, M. M., Altioik, S. (2013). Wee1 Inhibition by MK-1775 leads to tumor inhibition and enhances efficacy of gemcitabine in human sarcomas. *PLoS ONE*, 8(3), e57523.

- Kwon, I., Choe, H. K., Son, G. H., Kim, K. (2011). Mammalian molecular clocks. *Experimental Neurobiology*, 20(1), 18–28.
- Laranjeiro, R., Tamai, T. K., Peyric, E., Krusche, P., Ott, S., Whitmore, D. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor p20 controls circadian cell-cycle timing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6835–6840.
- Lee, S., Donehower, L. A., Herron, A. J., Moore, D. D., Fu, L. (2010). Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PLoS ONE*, 5(6), e10995.
- Leman, A. R., Noguchi, C., Lee, C. Y., Noguchi, E. (2010). Human timeless and tipin stabilize replication forks and facilitate sister-chromatid cohesion. *J Cell Sci*, 123, 660-670.
- Li, Z., Musich, P. R., Serrano, M. A., Dong, Z., Zou, Y. (2011). XPA-mediated regulation of global nucleotide excision repair by ATR is p53-dependent and occurs primarily in S-phase. *PLoS ONE*, 6(12), e28326.
- Lin, X., Chen, W., Wei, F., Ying, M., Wei, W., Xie, X. (2015). Night-shift work increases morbidity of breast cancer and all-cause mortality: a meta-analysis of 16 prospective cohort studies. *Sleep Med*, 16(11), 1381-1387.
- Liu, A. C., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., Welsh, D. K., Kay, S. A. (2008). Redundant function of REV-ERB α and β and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genetics*, 4(2), e1000023.
- Liu, B., Xu, K., Jiang, Y., Li, X. (2014). Aberrant expression of Per1, Per2 and Per3 and their prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(11), 7863–7871.
- Magnussen, G. I., Holm, R., Emilsen, E., Rosnes, A. K. R., Slipicevic, A., Flørenes, V. A. (2012). High expression of Wee1 is associated with poor disease-free survival in malignant melanoma: potential for targeted therapy. *PLoS ONE*, 7(6), e38254.
- Mao, Y., Fu, A., Leaderer, D., Zheng, T., Chen, K., Zhu, Y. (2013). Potential cancer-related role of circadian gene TIMELESS suggested by expression profiling and in vitro analyses. *BMC Cancer*, 13, 498.

- Massard, C., Soria, J. C., Anthoney, D. A. (2011). A first in man, phase I dose-escalation study of PHA-793887, an inhibitor of multiple cyclindependent kinases (CDK2, 1 and 4) reveals unexpected hepatotoxicity in patients with solid tumors. *Cell Cycle*, 10, 963–70.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. *Science*, 302 (5643), 255-259.
- Megyesi, J., Tarcsfalvi, A., Seng, N., Hodeify, R., Price, P. (2016). Cdk2 phosphorylation of Bcl-xL after stress converts it to a pro-apoptotic protein mimicking Bax/Bak. *Cell Death Discovery*, 2, 15066.
- Mueller, S., Hashizume, R., Yang, X., Kolkowitz, I., Olow, A. K., Phillips, J., Haas-Kogan, D. A. (2014). Targeting Wee1 for the treatment of pediatric high-grade gliomas. *Neuro-Oncology*, 16(3), 352–360.
- Murrow, L. M., Garimella, S. V., Jones, T. L., Caplen, N. J., Lipkowitz, S. (2010). Identification of WEE1 as a potential molecular target in cancer cells by RNAi screening of the human tyrosine kinome. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(2), 347–357.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*, 27(4), 254–271.
- Niedernhofer, L. J., Garinis, G. A., Raams, A., Lalai, A. S., Robinson, A. R. (2006). A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature*, 444, 1038–1043.
- Oakes, V., Wang, W., Harrington, B., Lee, W. J., Beamish, H., Chia, K. M., Gabrielli, B. (2014). Cyclin A/CDK2 regulates CDH1 and claspin during late S/G2 phase of the cell cycle. *Cell Cycle*, 13(20), 3302–3311.
- Okazaki, F., Matsunaga, N., Okazaki H., Utoguchi, N., Suzuki, R., Maruyama, K., Koyanagi, S., Ohdo, S. (2010). Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res*, 70(15), 6238-6246.

- Oshima, T., Takenoshita, S., Akaike, M., Kunisaki, C., Fujii, S., Nozaki, A., Numata, K., Shiozawa, M., Rino, Y., Tanaka, K., Masuda, M., Imada, T. (2011). Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. *Oncology reports*, 25(5), 1439-1446.
- Papantoniou, K., Castaño-Vinyals, G., Espinosa, A., Aragonés, N., Pérez-Gómez, B., Ardanaz, E., Altzibar, J. M., Sanchez, V. M., Gómez-Acebo, I., Llorca, J., Muñoz, D., Tardón, A., Peiró, R., Marcos-Gragera, R., Pollán, M., Kogevinas, M. (2015). Breast cancer risk and night shift work in a case-control study in a Spanish population. *European Journal of Epidemiology*.
- Peek, C., Ramsey, K., Levine, D., Marcheva, B., Perelis, M., Bass, J. (2015). Circadian regulation of cellular physiology. *Methods in Enzymology*, 552, 165–184.
- Preußner, M., Heyd, F. (2016). Post-transcriptional control of the mammalian circadian clock: implications for health and disease. *Pflugers Archiv*, 468, 983–991.
- Raghuram, S., Stayrook, K. R., Huang, P., Rogers, P. M., Nosie, A. K., McClure, D. B., Rastinejad, F. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(12), 1207–1213.
- Ralph, M. R., Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 241, 1225–1227
- Riedl, T., Hanaoka, F., Egly, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *The EMBO Journal*, 22(19), 5293–5303.
- Rogers, P. M., Ying, L., Burris, T. P. (2008). Relationship between circadian oscillations of Rev-erb α expression and intracellular levels of its ligand, heme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(4), 955–958.
- Ruby, N. F., Brennan T. J., Xie X., Cao V., Franken P., Heller H. C., O'Hara B. F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 13, 2211 – 2213
- Russel, P., Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by WEE1+, a gene encoding a protein kináze homolog. *Cell*, 49(4), 559-567.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Kang, T. H., Reardon, J. T., Lee, J. H., Ozturk, N. (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Letters*, 584(12), 2618–2625.

- Sato, F., Bhawal, U. K., Yoshimura, T., Muragaki, Y. (2016). DEC1 and DEC2 Crosstalk between circadian rhythm and tumor progression. *Journal of Cancer*, 7(2), 153–159.
- Shanware, N. P., Hutchinson, J. A., Kim, S. H., Zhan, L., Bowler, M. J., Tibbetts, R. S. (2011). Casein kinase 1-dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12766–12774
- Shell, S. M., Li, Z., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Brosey, C., Serrano, M. A., Zou, Y. (2009). Checkpoint Kinase ATR promotes nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage via physical interaction with xeroderma pigmentosum group A. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24213–24222.
- Shostak, A., Ruppert, B., Ha, N., Bruns, P., Toprak, U. H., Brunner, M. (2016). MYC/MIZ1-dependent gene repression inversely coordinates the circadian clock with cell cycle and proliferation. *Nature Communications*, 7, 11807.
- Schernhammer, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I., Colditz, G. A. (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93 (20), 1563-1568.
- Skaar, J. R., & Pagano, M. (2009). Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 816–824.
- Soták, M., Polidarová, L., Ergang, P., Sumová, A., Pácha, J. (2013). An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1032-1041.
- Tahashi, S., Lee, J., Kohda T., Matsuzawa, A., Kawasumi, M., Kanai-Azuma, M., Kaneko-Ishino, T., Ishino F. (2014). Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *The Company of Biologist*, 141, 3842-3847.
- Takeda, Y., Jothi, R., Birault, V., Jetten, A. M. (2012). RORγ directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Research*, 40(17), 8519–8535

- Tamura, K. (2015). Development of cell-cycle checkpoint therapy for solid tumors. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 45(12), 1097-1102. h
- Thin, T. H., Li, L., Chung, T. K., Sun, H., Taneja, R. (2007). Stra13 is induced by genotoxic stress and regulates ionizing-radiation-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 8(4), 401–407.
- Ünsal-Kaçmaz, K., Mullen, T. E., Kaufmann, W. K., Sancar, A. (2005). Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Molecular and Cellular Biology*, 25(8), 3109–3116.
- Wang, Y., Cheng, Y., Yu, G., Jia, B., Hu, Z., hang, L. (2016). Expression of PER, CRY, and TIM genes for the pathological features of colorectal cancer patients. *OncoTargets and Therapy*, 9, 1997–2005.
- Wu, X., Shell, S. M., Liu, Y., Zou, Y. (2007). ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene*, 26(5), 757–764.
- Yang, G., Zhou, Z., Cen, Y., Gui, X., Zeng, Q., Ao, Y., Zhang, A. (2015). Death receptor and mitochondria-mediated hepatocyte apoptosis underlies liver dysfunction in rats exposed to organic pollutants from drinking water. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 4719–4733.
- Yang, X., He, X., Yang, Z., Jabbari, E. (2012). Mammalian PER2 regulates AKT activation and DNA damage response. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(6), 675-682.
- Yang, X., Wood, P. A., Hrushesky, W. J. M. (2010). Mammalian TIMELESS is required for ATM-dependent CHK2 activation and G2/M checkpoint control. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3030–3034.
- Yellman, C. M., Roeder, G. S. (2015). Cdc14 early anaphase release, FEAR, is limited to the nucleus and dispensable for efficient mitotic exit. *PLoS ONE*, 10(6), e0128604.
- Yeh, K. T., Yang, M. Y., Liu, T. C., Chen, J. C., Chan, W. L., Lin, S. F., Chang, J. G. (2005). Abnormal Expression of Period 1 (PER1) in Endometrial Carcinoma. *The Journal of Pathology*, 206(1), 111-120.

- Yoshida, K., Sato, M., Hase, T., Elshazley, M., Yamashita, R., Usami, N., Hasegawa, Y. (2013). TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival. *Cancer Science*, 104(2), 171–177.
- Zhao, H., Zeng, Z. L., Yang, J., Jin, Y., Qiu, M. Z., Hu, X. Y., Zou, Q. F. (2014). Prognostic relevance of Period1 (Per1) and Period2 (Per2) expression in human gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(2), 619–630.